松墨天牛小热激蛋白基因的克隆、表达谱及对温度胁迫的响应

李 慧[1,2]，何玄玉[1,2]，陶 蓉[1,2]，陈宏建[1,2]，龚馨玥[1,2]，李寿银[1,2]，郝德君[1,2,*]

(1. 南京林业大学南方现代林业协同创新中心，南京 210037；2. 南京林业大学林学院，南京 210037)

摘要:【目的】松墨天牛 *Monochamus alternatus* 是我国南方松林中的重要蛀干害虫，也是林业检疫性病害——松材线虫病的主要媒介昆虫，其分布范围较广，对温度的适应性强，本研究旨在初步探讨松墨天牛对温度胁迫适应性的分子机制。【方法】采用 RT-PCR 与 RACE 技术克隆松墨天牛小热激蛋白(small heat shock protein, sHSP)基因的全长 cDNA，结合生物信息学方法分析小热激蛋白的结构特征；利用 qPCR 技术测定该基因在松墨天牛不同发育阶段、4 龄幼虫不同组织及不同低温和高温胁迫下 4 龄幼虫中的表达谱，并用 geNorm, NormFinder 和 BestKeeper 软件对不同温度下内参基因稳定性进行评价。【结果】获得松墨天牛 sHSP 基因的 cDNA 全长序列，命名为 *MaltHSP*21.20 (GenBank 登录号：MH091811)，全长为 871 bp，编码 187 个氨基酸，信号肽预测表明其 N 末端含有 18 个氨基酸的信号肽，成熟蛋白预测分子质量为 21.20 kD，等电点为 8.65。结构域预测符合小热激蛋白家族的特征，共含有 10 个 β 折叠片，在 α 结构域内含有 7 个 β 折叠片。进化树分析表明该蛋白氨基酸序列与光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* 的 sHSP 有较高的同源性。不同软件分析得到最稳定的内参基因存在差异，结合 3 种方法评价得出 *RPL*10 最为稳定。*MaltHSP*21.20 在不同发育阶段的松墨天牛体内均有表达，滞育幼虫中表达量最高，卵期及蛹期表达量次之；在 4 龄幼虫不同组织中均有分布，脂肪体中表达量最高；4 龄幼虫 *MaltHSP*21.20 对低温诱导无响应，其表达量在 35℃ 时显著上调，45℃ 处理 2 和 3 h 最高，50℃ 时下降。【结论】*RPL*10 是不同温度胁迫下较稳定的内参基因。相比其他热激蛋白基因，*MaltHSP*21.20 对低温敏感性较低，推测其在幼虫滞育越冬及抵抗高温中发挥重要作用。

关键词：松墨天牛；小热激蛋白；温度胁迫；内参基因；表达特性

中图分类号：S763.38 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2018)07-0749-12

cDNA cloning and expression profiling of small heat shock protein genes and their response to temperature stress in *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae)

LI Hui[1,2], HE Xuan-Yu[1,2], TAO Rong[1,2], CHEN Hong-Jian[1,2], GONG Xin-Yue[1,2], LI Shou-Yin[1,2], HAO De-Jun[1,2,*] (1. Co-Innovation Center for the Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract:【Aim】*Monochamus alternatus*, an important stem borer in pine forests in southern China, is a major vector of pine wilt disease. It has a wide range of distribution and strong resistance to temperature stress. The study aims to better understand the molecular mechanism of resistance to temperature stress in

基金项目：国家自然科学基金项目(31170606, 31470650)；江苏高校品牌专业建设工程资助项目(PPZY2015A062)

作者简介：李慧，女，1994 年生，辽宁丹东人，硕士研究生，研究方向为森林昆虫学，E-mail: 916298645@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: djhao@njfu.edu.cn

收稿日期 Received: 2018-03-03；接受日期 Accepted: 2018-03-26

M. alternatus.【Methods】The full-length cDNA encoding small heat shock protein (sHSP) was cloned from *M. alternatus* by RT-PCR and RACE techniques. The sequence characteristics of this sHSP were analyzed by bioinformatics methods. The expression patterns of this gene in different developmental stages, various tissues of the 4th instar larvae and the 4th instar larvae stressed under different low and high temperatures were detected by qPCR, and the stability of the reference genes at different temperatures was analyzed by geNorm, NormFinder and BestKeeper tools.【Results】The complete cDNA of the gene encoding sHSP was obtained from *M. alternatus*, and named *MaltHSP*21.20 (GenBank accession no.: MH091811). The complete cDNA (871 bp) encodes a protein of 187 amino acids, with a signal peptide of 18 amino acids in N-terminus, the molecular weight of 21.20 kD and the theoretical pI of 8.65. The domain prediction conforms to the characteristics of the sHSP family, containing 10 β-sheets and 7 β-sheets in the α-domain. Phylogenetic tree analysis showed that the sHSP sequence shares high homology with sHSP of *Anoplophora glabripennis*. The most stable reference gene was different identified by different methods, and assessed by three methods the most stable reference gene was *RPL*10. *MaltHSP*21.20 was expressed in all developmental stages of *M. alternatus*, with the highest expression level in diapause larvae, and moderate in egg and pupal stages. *MaltHSP*21.20 was expressed in different tissues of the 4th instar larvae, with the highest expression level in fat body. The expression of *MaltHSP*21.20 in the 4th instar larvae showed no response to low temperature, while was up-regulated significantly at 35℃, reached the maximum after exposure to 45℃ for 2 and 3 h, and down-regulated at 50℃.【Conclusion】*RPL*10 is a more stable reference gene under different temperature stress. Compared to other heat shock protein genes, *MaltHSP*21.20 is less sensitive to low temperature and presumably plays an important role in larval diapause during overwintering and the resistance to high temperature.

Key words: *Monochamus alternatus*; small heat shock protein; temperature stress; reference gene; expression pattern

温度对昆虫的生长发育、种群繁衍及扩散起到至关重要的作用,因此,昆虫的地理区系分布很大程度上取决于温度。环境温度过高或过低,均会对昆虫产生不良的影响,严重时会导致其死亡。昆虫在长期进化过程中,形成了耐受高温或低温的能力,这与昆虫体内的热激蛋白(heat shock proteins, HSPs)密不可分。热激蛋白又称作热休克蛋白,是一类生物体中普遍存在的应激蛋白,当生物体遭遇极端温度、饥饿胁迫、氧化胁迫、重金属胁迫时,会优先转录该蛋白,引导其他蛋白质的正确折叠,帮助生物体度过不良环境(Zhao and Jones, 2012)。根据分子量的大小,热激蛋白被划分为 HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 和 sHSP 5 个家族(Garrido *et al*., 2012)。

相对于其他热激蛋白,小热激蛋白(small heat shock proteins, sHSPs)在昆虫领域的研究相对较少(King *et al*., 2015)。小热激蛋白分子量在 12 ~ 43 kD 之间,包含一个由 80 ~ 100 个氨基酸组成的包含 9 个 β-折叠片的保守的 α 结构域,可变异的 N 端和可延伸的 C 端(Bagneris *et al*., 2009; Kostenko and Moens, 2009)。研究表明,sHSP 的分子伴侣及其功能主要取决于 α 结构域(Hayes *et al*., 2009)。小热激蛋白在生物机体应对外界胁迫时至关重要(Basha *et al*., 2012)。与其他分子伴侣相似,sHSP 可与变性的蛋白质结合,促进其正确折叠(Garrido *et al*., 2012)。不同的是,在此过程中不需要 ATP 的参与(van Montfort *et al*., 2001)。

与热激蛋白中的其他家族相似,小热激蛋白参与昆虫的温度胁迫反应。异色瓢虫 *Harmonia axyridis* 在热胁迫下,Hsp21.00, Hsp21.62, Hsp10.87 和 Hsp16.25 表达量呈现上升趋势(Wang *et al*., 2017);将家蚕 *Bombyx mori* 置于 34℃处理 1 ~ 7 d, BmHsp27.4 的表达量逐步上升(Wang *et al*., 2014);4℃冷胁迫诱导中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 的 AccsHsp22.6 大量表达(Zhang *et al*., 2014)。近些年研究发现,sHSP 还参与昆虫的发育,当幼虫向蛹转变时,sHSP 表达量的增加有助于变态过程中细胞的增殖以及组织和器官的再生(Huang *et al*., 2009)。一定浓度的 20-羟基蜕皮酮(20E)可以诱导 sHSP 的产生也验证了这一功能(Shen *et al*., 2011;

Zhang *et al.*, 2014）。当外界环境不利时，昆虫会进入滞育状态，以此度过不良环境，如蛀茎夜蛾 *Sesamia inferens* 进入滞育状态时，小热激蛋白的表达量升高，表明小热激蛋白可能参与昆虫滞育（Gkouvitsas *et al.*, 2008）。

松墨天牛 *Monochamus alternatus* 是我国南方松林中重要的蛀干害虫，也是松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 的主要传播媒介。松墨天牛幼虫在室内的最适生长发育温度为25℃，越冬幼虫的过冷却点为 −14.5℃（孔维娜等，2005）；滞育幼虫升温 12 ~ 15℃ 饲养，部分幼虫仍能化蛹及羽化（朱锦茹等，2001）。在其分布区，松墨天牛常常经历 40℃ 以上的高温或 −10℃ 以下的低温，表明其具有一定的抗寒性及耐热性，这些特性也是其扩散的关键因子所在。目前，从分子水平阐明对温度胁迫响应机制的报道仅限于对 HSP60，HSP70 及 HSP90 的表达特性研究（Cai *et al.*, 2017），关于松墨天牛小热激蛋白的研究未见报道。因此，本研究拟克隆松墨天牛小热激蛋白基因，并研究其在松墨天牛不同发育阶段、不同组织和温度胁迫下的表达特性，初步探讨其对温度胁迫响应的分子机制，进而为了解松墨天牛对温度适应性及扩散机制提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试虫来源及处理

松墨天牛 3 龄幼虫采自江西九江市松材线虫病致死的马尾松 *Pinus massoniana*，带回实验室，参照陈瑞旭等（2017）方法进行饲养，分别收集卵、4 龄幼虫、蛹及雌雄成虫并从野外直接采集越冬滞育 4 龄幼虫，转至液氮中速冻，置于 −80℃ 保存备用。选取 5 头 4 龄幼虫在生理盐水中解剖，获得表皮、血淋巴、脂肪体、马氏管、肠道，置于 RNAlater 中短时保存，通过离心法将 RNAlater 去除。由于 4 龄幼虫取食量较高，活力较强，并且在野外可能经历低温及高温环境，而滞育幼虫的 sHSP 可能不会被低温诱导（Sonoda *et al.*, 2006），因此本研究选择 4 龄非滞育幼虫在低温（−10，−5，0 和 5℃）和高温（35，40，45 和 50℃）处理 1，2 和 3 h，以 25℃ 作为对照，试虫保存方法同上。每头幼虫作为一个重复，设置 3 个生物学重复及 3 个技术重复。

1.2　供试试剂

1.2.1　载体及菌种：感受态细胞 Trans1-T1hase Resistant Chemically Competent Cell 和 pEASY-T1 载体购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2.2　主要试剂和工具酶：总 RNA 提取试剂 Trizol Reagent、微量样品总 RNA 提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒购自天根生化科技（北京）有限公司。Taq DNA 聚合酶购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司；反转录试剂盒（PrimerScript™ Ⅱ 1st Strand cDNA Synthesis Kit）、RACE 试剂盒（SMARTer ® RACE 5′/3′ Kit User Manual）、荧光定量 PCR 试剂（SYBR ® Premix Ex Taq™ Ⅱ）均购自 TaKaRa 公司。

1.2.3　引物及测序：所用引物自行设计并由金斯瑞生物科技有限公司合成，质粒测序由上海杰李生物技术有限公司完成，转录组测序由北京百迈客生物科技有限公司测定。

1.3　松墨天牛小热激蛋白基因全长 cDNA 的克隆

采用 Trizol 法提取松墨天牛 4 龄幼虫总 RNA，结合微量紫外分光光度仪（NanoDrop ND-1000，美国）和琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的质量和浓度，依据反转录试剂盒说明书获得 cDNA 第 1 链。根据转录组数据 SRX309376（Lin *et al.*, 2015），设计 3′RACE 和 5′RACE 引物 HSP21.20-5′/HSP21.20-3′，（表 1），以松墨天牛 4 龄幼虫 cDNA 为模板，根据 RACE 试剂盒操作步骤进行 3′和 5′RACE 的 PCR 扩增，将 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后切胶纯化，克隆于 pEASY-T1 载体，导入大肠杆菌 *Escherichia coli Trans*1-*T*1 之后在含有氨苄的并涂有 IPTG 及 X-gal 的 LB 琼脂板上 37℃ 过夜培养，挑取阳性克隆于 LB 液体培养基中 37℃ 200 r/min 孵育 2 h，再进行菌液 PCR 鉴定。送样测序，将获得的测序片段进行拼接获得松墨天牛小热激蛋白基因的全长 cDNA 序列。

1.4　生物信息学分析

同源序列搜索使用在线工具（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/），序列拼接及比对使用 DNAMAN 软件，进化树构建使用 MEGA6.0 软件，信号肽预测利用在线网站（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/），等电点及分子质量预测利用在线网站（http://web.expasy.org/compute_pi/），二级结构预测利用在线软件 NPS 的 PHD 法（http://npsa-pbil.ibcp.fr/），蛋白三维结构的预测利用在线网站 swiss model（http://www.swiss model.expasy.org/）。

1.5　松墨天牛小热激蛋白基因表达谱的测定

1.5.1　RNA 的提取及 cDNA 第 1 链的获得：将 1.1 节收集的不同样品依照 1.3 节的方法提取 RNA 合成 cDNA 第 1 链。

1.5.2 内参基因的筛选及引物设计：本研究选择 *GAPDH* 作为松墨天牛不同发育阶段及不同组织基因表达分析的内参基因（冯波等，2016），内参基因扩增引物为 GADPH-F/GADPH-R（表 1）。基于冯波等(2016)从松墨天牛转录组中鉴定出 9 个候选内参基因（*Actin*，*TUB*，18S rRNA，*RPS27A*，*RPS*3，*RPL*10，*AK*，*GAPDH* 和 *EF1A*）分别设计引物 Actin-F/Actin-R，TUB-F/TUB-R，18S rRNA-F/18S rRNA-R，RPS27A-F/RPS27A-R，RPS3-F/RPS3-R，RPL10-F/RPL10-R，AK-F/AK-R，GAPDH-F/GAPDH-R 和 EF1A-F/EF1A-R（表 1），筛选温度胁迫下最稳定的内参基因。根据本研究克隆得到的目的基因 cDNA 序列，设计并筛选出实时荧光定量 PCR 引物 HSP21.20qF/HSP21.20qR（表 1）。

表 1 所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primers	引物序列(5′-3′) Primer sequences	引物用途 Use of primers
HSP21.20-5′	GATTACGCCAAGCTTAAACTCCATCCGAGGACAAT	5′RACE
HSP21.20-3′	GATTACGCCAAGCTTTGAAGAAAAGCCGGATGAAC	3′RACE
HSP21.20qF	ATTGTCCTCGGATGGAGTTT′	qPCR
HSP21.20qR	GCCTCTTCAGGCACTTCTT′	
Actin-F	CGAACAGGAAATGGCTACCG	内参基因筛选 Selection of the reference gene
Actin-R	CGTCGCACTTCATGATGGAG′	
TUB-F	AATCACCAACGCCTGTTTCG	
TUB-R	TGGCAATAGCAGCGTTTACG	
18S rRNA-F	AGAAACGGCTACCACATCCA	
18S rRNA-R	GCGGGACACAGATTCGACTA	
RPS27A-F	CGCCGGAAAACAATTGGAAG	
RPS27A-R	GCATTCACGTCTCAATCTGTGG	
RPS3-F	ATGTGGAGCTAAAGGTTGCG	
RPS3-R	AAACGTTATCGGGCAAAGGC	
RPL10-F	GACAAACGTTTCAGCGGAAC	
RPL10-R	TGCTGTTGATCGCCCAAAAC	
AK-F	TCCCGCTGGTGAATTTGTTG	
AK-R	AGCCTGCAAGAAACGATCAC	
GAPDH-F	TCGAACGCTTCATGCACAAC	
GAPDH-R	CCATCACGCCACAATTTTCC	
EF1A-F	GACAGCTCCATTTTCCACGTTG	
EF1A-R	TTCGGGCGCTTTTCCAAATG	

1.5.3 标准曲线的制作和 qPCR：qPCR 在 Applied Biosystem 7500 System（美国）上进行，反应体系为 20 μL：SYBR Premix Ex Taq Ⅱ 10 μL，ROX Reference Dye 0.4 μL，上下游引物各 0.8 μL，cDNA 模板 2 μL，ddH_2O 6 μL。反应条件：95℃ 预变性 30 s；95℃ 5 s，60℃ 34 s，40 个循环；最后在 54～95℃进行熔解曲线分析，经熔解曲线分析确认所设计的引物没有非特异扩增及引物二聚体后，将 cDNA 模板按 1∶10（v/v）稀释成 5 个浓度梯度进行标准曲线分析，并计算不同引物的扩增效率，每个模板设 3 个生物学重复。

1.5.4 内参基因评价方法：采用内参基因评价软件 geNorm（Vandesompele *et al*.，2002），NormFinder（Anderson *et al*.，2004）和 BestKeeper（Pfaffl *et al*.，2004），严格按照软件使用说明对各候选内参基因进行评估分析。利用 geNorm 分析时，表达稳定值 M 小于 0.5 时即表示该基因为稳定表达（Hellemans *et al*.，2007）。NormFinder 与 geNorm 相似。在利用 BestKeeper 软件分析时，标准差（*SD*）和变异系数（*CV*）越小，越适合作为内参基因（Pfaffl *et al*.，2004）。

不同发育阶段及不同组织的荧光定量结果用 $2^{-\Delta Ct}$ 法计算相对表达量高低（Ct 为循环阈值，表示每个反应中荧光信号到达设定阈值的循环数）；温度胁迫下的荧光定量结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达

量，ΔCt = 目的基因平均 Ct 值 − 内参基因平均 Ct 值，ΔΔCt = ΔCt 样品 2 − ΔCt 样品 1（Livak and Schmittgen，2001），其中，样品 1 为对照组，样品 2 为不同温度胁迫下的处理组。

1.6　数据处理

所用数据处理软件为 IBM SPSS Statistics 20，采用 Duncan 氏多重检验法对不同发育阶段、不同组织及温度处理样品中松墨天牛小热激蛋白基因相对表达量的差异进行显著性方差分析，差异显著性水平均为 $P < 0.05$。

2　结果

2.1　松墨天牛小热激蛋白基因 cDNA 的全长克隆及序列分析

通过 RACE 扩增并克隆获得松墨天牛的小热激蛋白基因 cDNA 全长，序列分析表明该基因 cDNA 全长为 871 bp，包括 137 bp 的 5′非翻译区，173 bp 的 3′非翻译区，以及 561 bp 的开放阅读框，编码 187 个氨基酸，信号肽预测表明 N 末端含有 18 个氨基酸组成的信号肽，成熟蛋白预测分子质量 21.20 kD，等电点为 8.65，将其命名为 *MaltHSP*21.20（GenBank 登录号：MH091811）（图 1）。推导的氨基酸序列进行结构域预测，在第 64 − 146 位氨基酸残基形成了 α-晶体蛋白质结构域，蛋白质二级结构预测共含有 10 个 β 折叠片，在 α-结构域内含有 7 个 β 折叠片（图 1）。利用 SWISS-MODEL 工具建模，预测松墨天牛的 HSP21.20 蛋白的三维结构与已知其他物种小热激蛋白的三维结构高度相似，该模型也显示 MaltHSP21.20 由 N 端、C 端和 β 折叠组成的 α-结构域构成（图 2）。

在 NCBI 上同源搜索鞘翅目其他 10 个物种的 sHSP 序列，并与 MaltHSP21.20 一起应用 MEGA6.0 软件邻接法（neighbor-joining method，NJ）进行 1 000 次抽样分析来构建系统进化树（图 3）。结果显示，松墨天牛的 MaltHSP21.20 与光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* 的 sHSP 聚为一支，松墨天牛与光肩星天牛同属天牛科（Cerambycidae），此外同属叶甲科（Chrysomelidae）的大猿叶甲 *Colaphellus bowringi* 和蓼蓝齿胫叶甲 *Gastrophysa atrocyanea* 的 sHSP 也聚为一支，表明鞘翅目昆虫 sHSP 的聚类关系在一定程度上反映其亲缘关系。

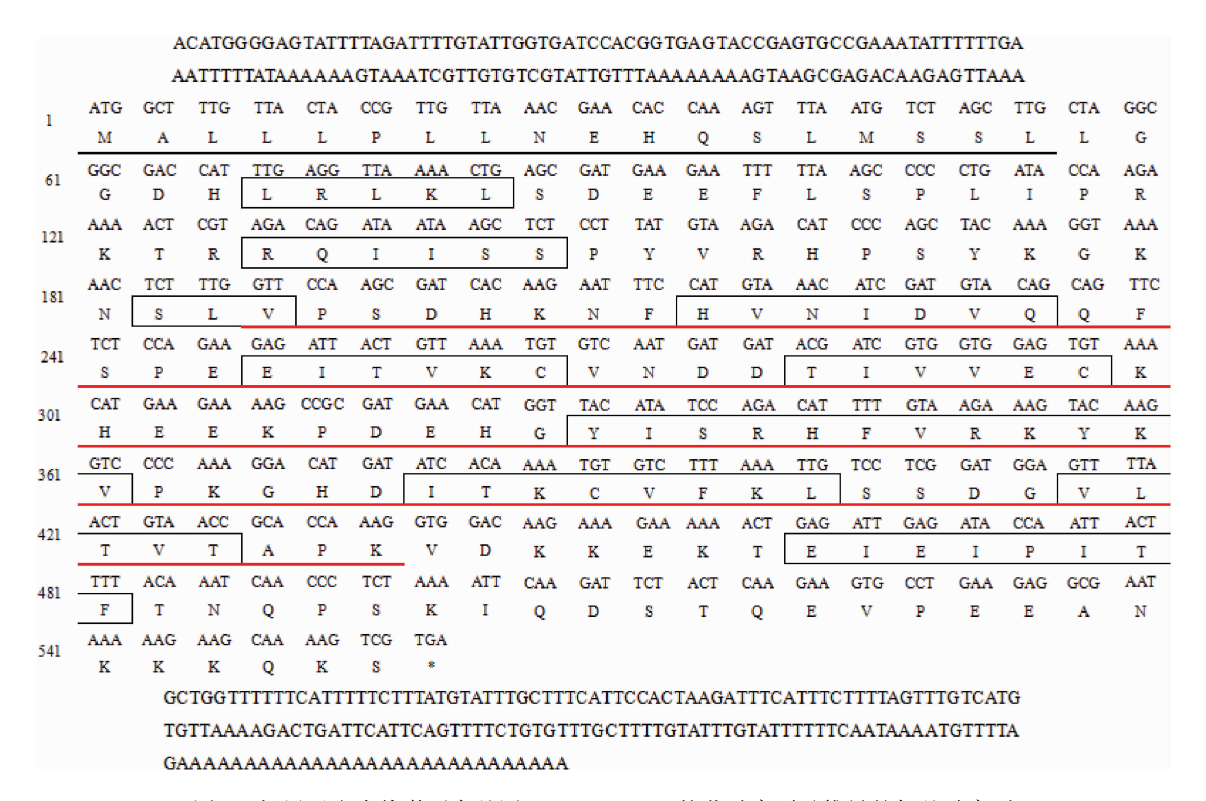


图 1　松墨天牛小热激蛋白基因 *MaltHSP*21.20 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide and deduced amino acid sequences of *MaltHSP*21.20 from *Monochamus alternatus*

星号表示终止子；黑色下划线为预测的信号肽序列；红色下划线为预测的 α-结构域；每个方框为一个 β 折叠。The stop codon is indicated by an asterisk, putative signal peptide sequences are underlined in black, predicted α-domains are underlined in red, and every box shows a β-sheet.

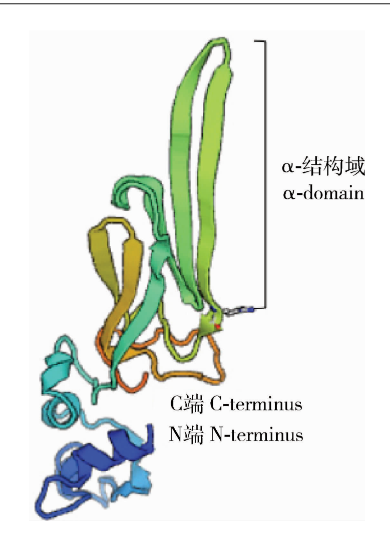


图 2　预测的 *MaltHSP*21.20 编码蛋白的三维结构
Fig. 2　The predicted three-dimensional structure of the encoded protein of *MaltHSP*21.20

2.2　不同温度胁迫下松墨天牛内参基因的筛选

以松墨天牛 cDNA 为模板进行 qPCR 分析，结果表明 9 个内参基因引物扩增的熔解曲线都只有明显的单一峰，说明所采用的引物均可特异性地扩增各内参基因的相应产物，不存在引物二聚体。且 9 个基因的扩增效率为 0.80 ~ 1.08，R^2 值均在 98% 以上，说明荧光定量结果是可信的。应用 geNorm，BestKeeper 和 NormFinder 软件对不同温度处理 1 h 样品的 9 个候选内参基因表达的稳定性进行评价。geNorm 结果显示 *EF1A*，*RPL*10 和 *RPS27A* 符合要求(M < 0.5)(图 4)。在此基础上，又结合 NormFinder 和 BestKeeper 软件进行稳定性评价。NormFinder 结果显示 18S rRNA 最为稳定，而 *EF1A*，*RPL*10 及 *RPS27A* 也较为稳定，稳定值分别为 0.163，0.227 和 0.183，均小于 0.5。BestKeeper 结果显示，*EF1A* 的标准差 *SD* 为 2.58，变异系数 *CV* 为 3.55；*RPL*10 的标准差 *SD* 为 1.91，变异系数 *CV* 为 3.01；*RPS27A* 的标准差 *SD* 为 2.22，变异系数 *CV* 为 3.91。综上所述，*RPL*10 在不同温度胁迫下是较为稳定的内参基因(表 2)。

2.3　松墨天牛 *MaltHSP*21.20 mRNA 在不同发育阶段及不同组织中的相对表达量

由图 5 可以看出，*MaltHSP*21.20 基因在松墨天牛的卵期、幼虫期、滞育幼虫期、蛹期和雌雄成虫中均有表达，在滞育幼虫中表达量最高，为 4 龄幼虫中的 7 倍，卵期及蛹期表达量次之，其余时期无显著差异($P > 0.05$)。*MaltHSP*21.20 在幼虫的表皮、马氏管、血淋巴、脂肪体和肠道中均有表达，其中，在脂肪体中表达量显著高于其他组织($P < 0.05$)，而在表皮中表达量最低(图 6)。

2.4　不同温度胁迫下松墨天牛 *MaltHSP*21.20 mRNA 的相对表达量

利用 2.2 节筛选出的温度胁迫下较稳定的内参基因 *RPL*10，以 25℃ 为对照，计算不同温度胁迫下 *MaltHSP*21.20 的相对表达量，其引物 HSP21.20qF/HSP21.20qR 扩增效率为 0.92，R^2 为 99%。采集荧光信号进行溶解曲线分析，都只出现单一的信号峰，说明没有非特异性扩增。

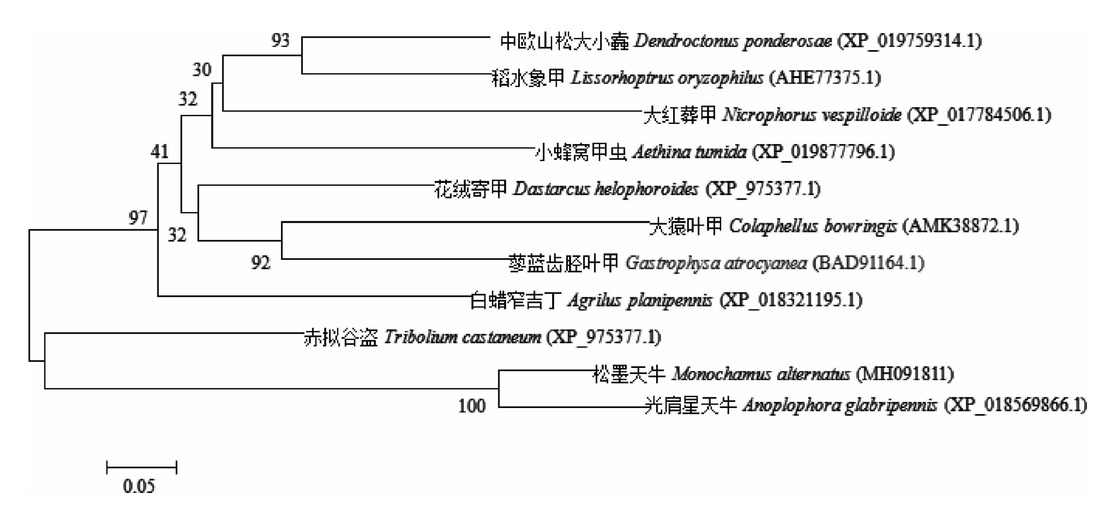


图 3　基于氨基酸序列用邻接法构建松墨天牛的 MaltHSP21.20 与其他鞘翅目昆虫 sHSP 蛋白的系统发育树
Fig. 3　Phylogenetic analysis of MaltHSP21.20 in *Monochamus alternatus* and sHSP proteins from other Coleoptera species with neighbor-joining method based on amino acid sequences
图中的数值代表 bootstrap 为 1 000 次时的支持度值，标尺代表遗传距离。Bootstrap support values based on 1 000 replicates are indicated, and the scale bar indicates the genetic distance.

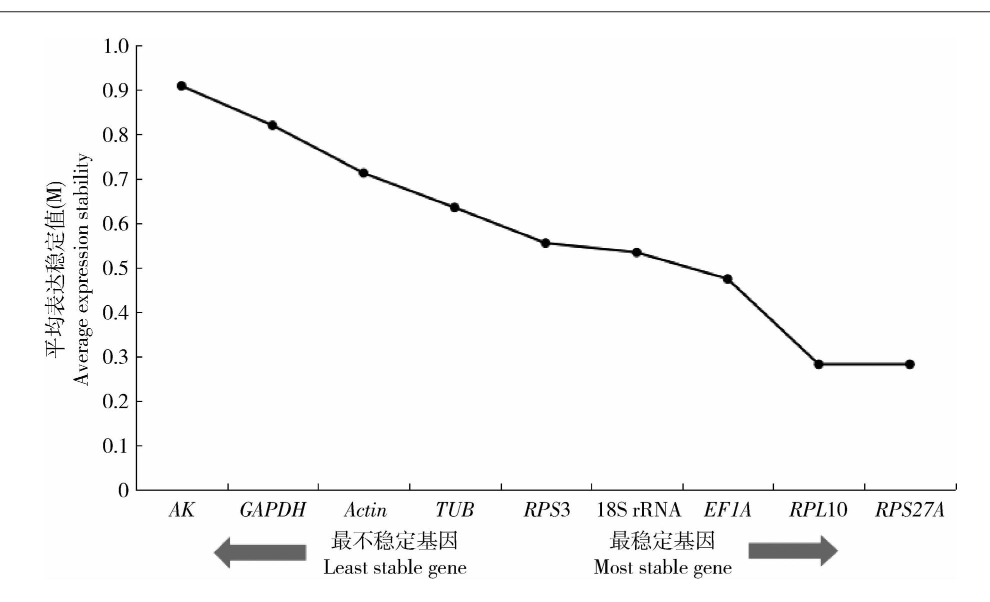


图 4　应用 geNorm 软件分析不同温度胁迫下松墨天牛 4 龄幼虫内参基因的平均表达稳定值(M)

Fig. 4　Average expression stability (M) of reference genes in the 4th instar larvae of *Monochamus alternatus* after exposure to different temperatures analyzed by geNorm

表 2　应用 NormFinder，BestKeeper 软件分析不同温度胁迫下松墨天牛 4 龄幼虫内参基因的稳定性

Table 2　Expression stability of reference genes in the 4th instar larvae of *Monochamus alternatus* after exposure to different temperatures analyzed by NormFinder and BestKeeper

内参基因 Reference gene	NormFinder	BestKeeper			
	稳定值 Stability	*r*	*SD*	*CV*	*P*
Actin	0.294	0.625	1.80	3.47	0.098
AK	0.374	0.083	1.08	3.35	0.848
EF1A	0.163	0.894	2.58	3.55	0.003
GAPDH	0.362	0.621	2.05	3.54	0.100
RPL10	0.227	0.747	1.91	3.01	0.033
RPS3	0.201	0.821	2.16	3.84	0.013
RPS27A	0.183	0.873	2.22	3.91	0.005
TUB	0.302	0.884	3.22	5.65	0.004
18S rRNA	0.153	0.903	1.87	5.64	0.002

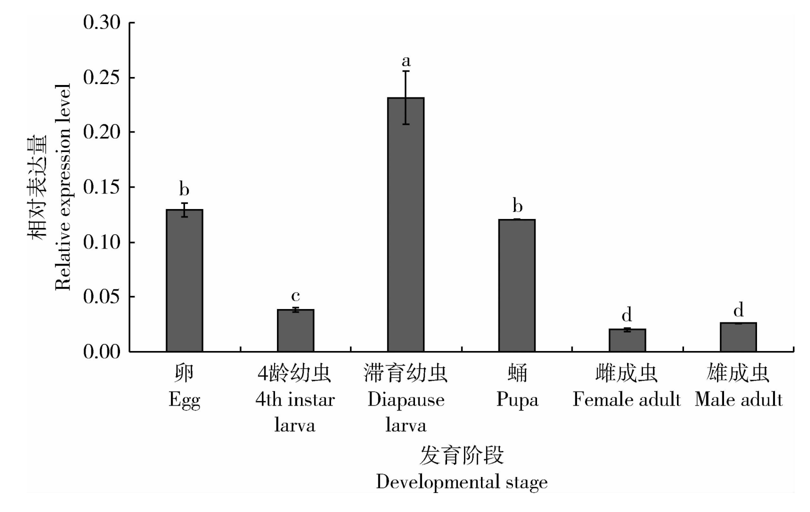


图 5　*MaltHSP*21.20 在松墨天牛不同发育阶段的相对表达量

Fig. 5　Relative expression level of *MaltHSP*21.20 in different developmental stages of *Monochamus alternatus*

图中数据为平均值 ± 标准误；柱上不同小写字母表示不同发育阶段间差异显著($P<0.05$)(Duncan 氏多重检验)。Data in the figure are mean ± *SE* and different letters above bars indicate significant difference among different developmental stages ($P<0.05$)(Duncan's multiple range test).

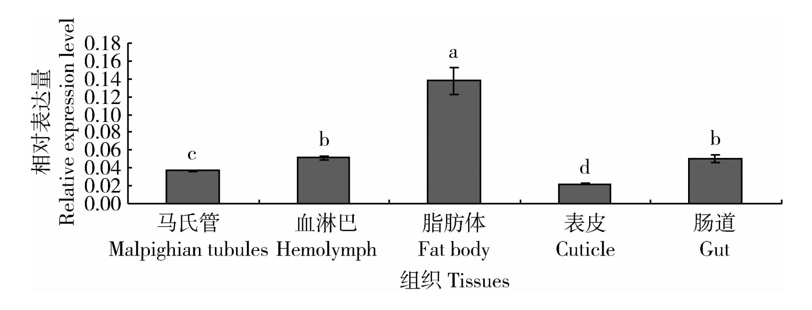


图 6 *MaltHSP*21.20 在松墨天牛 4 龄幼虫不同组织中的相对表达量

Fig. 6 Relative expression level of *MaltHSP*21.20 in the 4th instar larvae of *Monochamus alternatus*

图中数据为平均值 ± 标准误；柱上不同小写字母表示不同组织间差异显著($P<0.05$)(Duncan 氏多重检验)。Data in the figure are mean ± *SE* and different letters above bars indicate significant difference among different tissues ($P<0.05$) (Duncan's multiple range test).

对松墨天牛 4 龄幼虫在 5, 0, −5 和 −10℃ 分别处理 1, 2 和 3 h,与对照组相比,0, −5 和 −10℃ 处理 1 h *MaltHSP*21.20 相对表达量上调,5℃ 3 h 处理组表达量略上调,低温处理下各温度梯度及各时间梯度并未呈一定的相关性,只有几个梯度与对照相比有显著性差异,但上调幅度较低。0℃ 1 h 处理组相对表达量最高,为对照组的 2.82 倍 (图 7)。

在高温胁迫处理组中,几乎每个温度梯度在各个时间段相对表达量与对照相比均有显著性差异($P<0.05$)。在 35℃ 处理中,*MaltHSP*21.20 表达量与对照组相比已上调。随着温度的升高,40℃ 表达量继续升高,并与处理时间呈正相关。在 45℃ 处理 2 和 3 h 时 *MaltHSP*21.20 的相对表达量最高,为同时间段对照组的 30.14 倍。但是在 50℃ 处理组中,相对表达量呈现下降趋势,但与对照组相比依然是上调(图 8)。

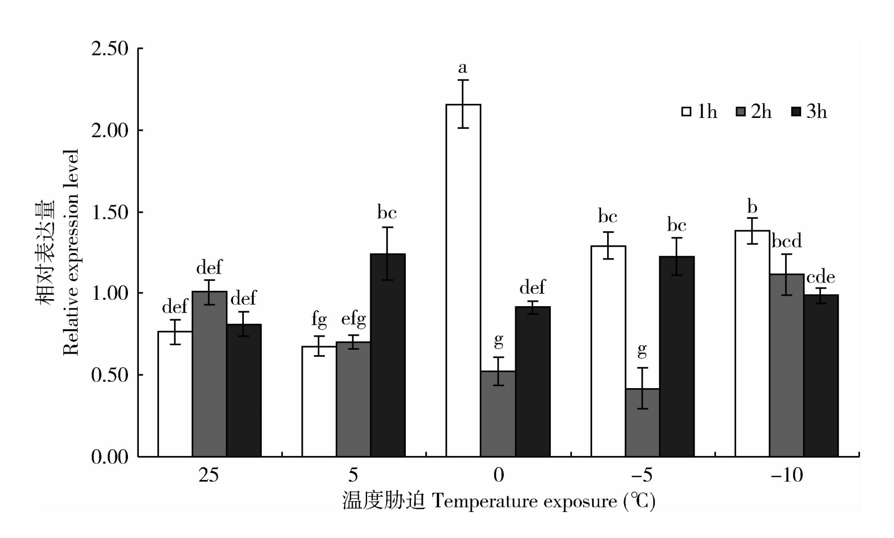


图 7 低温处理不同时间后松墨天牛 4 龄幼虫中 *MaltHSP*21.20 的相对表达量

Fig. 7 Relative expression levels of *MaltHSP*21.20 in the 4th instar larvae of *Monochamus alternatus* after exposure to different low temperatures for different time

图中数据为平均值 ± 标准误；柱上不同小写字母表示处理不同时间不同温度处理组间差异显著($P<0.05$)(Duncan 氏多重检验)。图 8 同。Data in the figure are mean ± *SE* and different letters above bars indicate significant difference among different treatment temperatures for different time ($P<0.05$) (Duncan's multiple range test). The same for Fig. 8.

3 结论与讨论

3.1 松墨天牛 *MaltHS*P21.20 的序列分析

本研究通过生物信息学手段结合 RT-PCR 和 RACE 技术,首次克隆了一个松墨天牛的 sHSP 基因的 cDNA 全长序列,命名为 *MaltHS*P21.20。氨基酸序列分析表明,该基因符合 sHSP 家族的结构特点。进行蛋白质三维结构建模也得出了相同的结果,MaltHSP21.20 属于典型的 sHSP 家族。α 结构域对小热激蛋白的分子伴侣及对底物蛋白的特异性结合是十分重要的 (Basha *et al.*, 2006)。β-折叠对于低

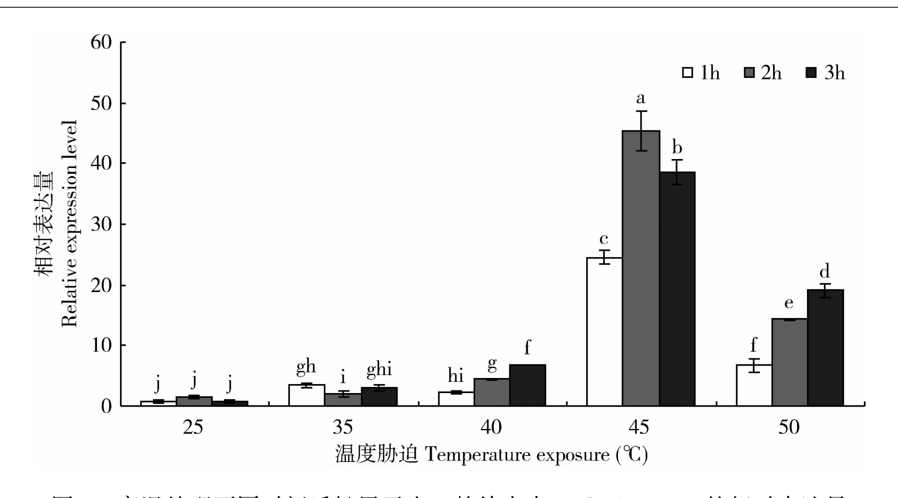


图 8　高温处理不同时间后松墨天牛 4 龄幼虫中 *MaltHSP*21.20 的相对表达量

Fig. 8　Relative expression levels of *MaltHSP*21.20 in the 4th instar larvae of *Monochamus alternatus* after exposure to different high temperatures for different time

聚物的形成十分必要（Hayes *et al.*, 2009），但其数量在不同昆虫的 sHSP 内存在差异。MaltHSP21.20 在 α-结构域内有 7 个 β-折叠，斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 的 6 条 sHSP 均含有 7 个 β-折叠（Shen *et al.*, 2011），而中华蜜蜂 *A. cerana cerana* 的 sHSP22.6 共含有 8 个 β-折叠，在 α-结构域内有 4 个 β-折叠（Zhang *et al.*, 2014），不同昆虫体内 sHSP β-折叠数量的不同可能暗示着其功能上的差异。

系统发育树分析表明松墨天牛的 MaltHSP21.20 与光肩星天牛的 sHSP 极相似，可能是由于二者同属天牛科，在进化上亲缘关系较近。叶甲科的大猿叶甲和蓼蓝齿胫叶甲的 sHSP 也较为接近，柞蚕 *Antheraea pernyi* 的 sHSP21 与其他鳞翅目昆虫 sHSP 的氨基酸序列一致性在82%~93% 之间，柞蚕的 sHSP21 与绿尾大蚕蛾 *Actias selene ningpoana* 的 sHSP 高度相似（Liu *et al.*, 2013），表明昆虫 sHSP 的聚类关系在一定程度上反映其亲缘关系。松墨天牛其他家族的 HSP 与鞘翅目的物种 HSP 也具有很近的亲缘关系，与 MaHSP60 的氨基酸序列一致性为 80% ~93%，与 MaHSP70 的氨基酸序列一致性为 87% ~91%，与 MaHSP90 的氨基酸序列一致性为 89% ~94%，表明松墨天牛的热激蛋白家族与鞘翅目其他种类的热激蛋白有高度相似性（Cai *et al.*, 2017）。

3.2　松墨天牛 *MaltHSP*21.20 的时空表达特性分析

*MaltHSP*21.20 在松墨天牛不同发育阶段中均有表达，其中在滞育幼虫中表达量最高。在已有研究的与滞育相关的基因中，热激蛋白基因被认为是与滞育关系最为密切（Rinehart *et al.*, 2007）。松墨天牛以幼虫滞育越冬，在滞育过程中，体内 ATP 合成极少，而 sHSP 是一类不需要 ATP 参与的分子伴侣，因此，推测 *MaltHSP*21.20 参与松墨天牛滞育时抵御外界低温。其他昆虫如肉蝇 *Sarcophaga crassipalpis* 体内的 hsp23 与其滞育密切相关，即滞育起始阶段 hsp23 含量明显增加，在整个滞育过程中一直维持较高含量，滞育的终止期含量下降（Hayward *et al.*, 2005）。已有研究表明，sHSP 在昆虫生长发育中十分重要。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 sHSPs 在身体重构和变态阶段（胚胎、幼虫、蛹）具有较高的表达水平（Takahashi *et al.*, 2010）。斜纹夜蛾的 HSP20.8 在整个发育阶段中蛹期的表达量最高（Shen *et al.*, 2011），本研究结果显示：相对于幼虫及雌雄成虫，*MaltHSP*21.20 在卵及蛹期表达量也较高，这也暗示 *MaltHSP*21.20 可能参与松墨天牛的生长发育。另外，昆虫体内的小分子量热激蛋白的表达还存在雌雄差异并参与生殖（Lu *et al.*, 2013），但是松墨天牛的 *MaltHSP*21.20 在雌雄成虫间表达量较低且无差异，推测松墨天牛体内存在其他的 sHSP 参与其生殖过程。

脂肪体是昆虫解毒及储存能量的主要器官（吴秋雁，1981）。本研究结果表明松墨天牛的 *MaltHSP*21.20 在脂肪体中表达量最高，而松墨天牛的 HSP60 和 HSP90 也在脂肪体中表达量最高（Cai *et al.*, 2017），可以推测脂肪体在松墨天牛抵御环境胁迫时发挥作用。二化螟 *Chilo suppressalis* 的 *Cshsp*22.9b 和 *Cshsp*24.3 也在脂肪体中高度表达（Pan *et al.*, 2018）。但是，斜纹夜蛾的 6 个 sHSP 基因均在马氏管中表达量最高（Shen *et al.*, 2011），中

华蜜蜂的 *sHSP*22.6 在肠道和表皮中表达量最高(Zhang *et al*., 2014)。虽然不同昆虫 sHSP 基因在不同组织中表达量有所差异,但是脂肪体、马氏管、肠道均为昆虫能量代谢的主要器官(Enayati *et al*., 2005),表皮是昆虫与外界接触的首要组织(Marionnet *et al*., 2003),说明昆虫的 sHSP 在抵御外界胁迫时极其重要。

3.3 温度胁迫下内参基因分析及 *MaltHS*P21.20 的表达特性分析

选择合适的内参基因对荧光定量的准确性是极其重要的一个环节。松墨天牛基因表达研究中,使用的内参基因为 *β-actin*(罗淋淋等, 2015)和 18S rRNA(钱凯等, 2015)。冯波等(2016)研究发现,*β-actin* 和 18S rRNA 在所用化学感受组织间的表达不稳定,发现 *GAPDH* 是松墨天牛化学感受基因表达分析的首选内参基因。本研究结果表明,在热胁迫下,*GAPDH* 不稳定,而较为稳定的内参基因为 *RPL*10。在同一种类不同处理中最稳定的内参基因存在差异并不少见。如斜纹夜蛾在不同发育阶段内参基因 *GAPDH* 和 *UCCR* 最稳定,不同组织部位 *RPL*10, *AK* 和 *EF*1 稳定,不同温度处理下 *GAPDH* 和 *EF*1 最稳定(Lu *et al*., 2013)。由于受内外环境的影响,在细胞中真正恒定表达的基因并不存在。目前最常用的用于内参稳定性评价的 3 种软件分别是 geNorm, NormFinder 和 BestKeeper。3 种软件评价结果基本一致,但 3 种软件因分析方法存在一定差异。*EF1A*, *RPL*10 和 *RPS27A* 均符合内参稳定性要求,但是 *RPL*10 最为稳定。

松墨天牛幼虫的过冷却点为 -14.5℃,而对其 4 龄幼虫进行冷胁迫发现,与 25℃对照组相比,处理 1~3 h,仅少数几个温度梯度能够诱导 *MaltHS*P21.20 的表达,并且其对冷胁迫的响应并不显著。0℃ 1 h 处理斜纹夜蛾 6 龄幼虫,*HSP*19.7, *HSP*20, *HSP*20.7 和 *HSP*21.4 表达量并无显著变化,而 *HSP*20.4 和 *HSP*20.8 对冷胁迫做出明显回应(Shen *et al*., 2011)。异色瓢虫体内的 *HSP*36.77 在 -5℃ ~ -15℃内相较于 25℃对照组无差异,而其他 5 个 sHSP 基因则上调表达(Wang *et al*., 2017)。因此,推测松墨天牛的 *MaltHS*P21.20 不参与冷胁迫,可能其他 sHSP 基因参与低温时机体的自我保护。

热胁迫时,35℃处理 1 h 时 *MaltHS*P21.20 已经上调,并与温度及时间梯度呈现正相关,直至 45℃ 2 h和 3 h 时相对表达量最高。表明 *MaltHS*P21.20 在松墨天牛抵御热胁迫时发挥重要作用。尽管松墨天牛在其生活史中极少遇到 50℃的高温,本研究设置了 50℃的处理组是为了探究 *MaltHS*P21.20 是否会随着温度上升不断上调。结果表明,50℃相较于 45℃处理,已经表现明显的下降趋势,可能是由于极端高温破坏了昆虫体内的正常生理状况,即使是应对胁迫的小热激蛋白的合成也出现异常,亦有可能是过量的表达热激蛋白对昆虫机体本身有害,昆虫会为了维持生存付出一定的代价中寻求一个平衡点(Sørensen *et al*., 2003)。热胁迫时不同昆虫 sHSP 基因的表达模式也存在差异。云杉卷蛾 *Pseudotomoides strobilellus* 的 *HSP*22.1 和 *HSP21.5b* 在 32℃时出现表达量明显上调,37℃达到峰值,但在 42℃则呈现明显下降(Quan *et al*., 2018)。二化螟的 sHSP 基因在 33℃出现上调,而在 39℃达到高峰,43℃开始下降(Pan *et al*., 2018)。不同昆虫小热激蛋白的诱导温度和表达量最高温度存在差异,说明不同昆虫对温度的耐受性不同。南美斑潜蝇 *Liriomyza huidobrensis* 中 HSP 基因表达的温度比美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae* 的低,与前者生活区域向北这一习性相似(Huang and Kang, 2007)。

松墨天牛的 MaHSP60 和 MaHSP90 基因也未被低温诱导,在 35℃时表达量最高,而 MaHSP70 基因在低温被诱导(Cai *et al*., 2017),表明松墨天牛体内的 HSP 家族行使不同的功能,在应对温度胁迫时,松墨天牛体内并非某一热激蛋白起作用,而是由不同家族的热激蛋白共同协作。松墨天牛体内不同 HSP 家族是如何协作来抵御环境胁迫还值得进一步探讨。小热激蛋白是昆虫抵御胁迫时的第一道防线,由于 *MaltHS*P21.20 对低温不敏感,但松墨天牛体内可能存在其他的 sHSP 作为冷胁迫的首要防线,*MaltHS*P21.20 基因的功能以及松墨天牛体内其他的 sHSP 基因有待进一步挖掘。

昆虫是变温动物,其对温度的耐受性直接影响了种群的消长。松墨天牛是松材线虫的传播媒介,其对温度的适应性不仅影响其地理分布,还可影响到松材线虫病的发生范围。本研究成功克隆松墨天牛 *MaltHS*P21.20 基因全长 cDNA,分析表明该基因符合典型的小热激蛋白家族的结构特征;*MaltHS*P21.20 参与松墨天牛幼虫滞育越冬及生长发育,也可能参与松墨天牛的解毒及代谢;温度胁迫下 *MaltHS*P21.20 的表达模式表明,*MaltHS*P21.20 对低温不敏感,可能在松墨天牛幼虫抵御高温胁中发挥作用。本研究结果为理解松墨天牛抗温度胁迫能力提供了依据,后续将对该基因的功能进行深入

研究，此外，松墨天牛体内其他小热激蛋白的表达特性及与其他热激蛋白家族的互作关系尚需进一步探索。

参考文献（References）

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF, 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.*, 64(15): 5245 – 5250.

Bagneris C, Bateman OA, Naylor CE, Cronin N, Boelens WC, Keep NH, Slingsby C, 2009. Crystal structures of α-crystallin domain dimers of αB-crystallin and Hsp20. *J. Mol. Biol.*, 392(5): 1242 – 1252.

Basha E, Friedrich KL, Vierling E, 2006. The N-terminal arm of small heat shock proteins is important for both chaperone activity and substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, 281(52): 39943 – 39952.

Basha E, O'Neill H, Vierling E, 2012. Small heat shock proteins and α-crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends Biochem. Sci.*, 37(3): 106 – 117.

Cai Z, Chen J, Cheng J, Lin T, 2017. Overexpression of three heat shock proteins protects *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) from thermal stress. *J. Insect Sci.*, 17(6): 1 – 11.

Chen RX, Wang LJ, Lin T, Wei ZQ, Wang Y, Hao DJ, 2017. Rearing techniques of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae) on artificial diets. *J. Nanjing For. Univ. (Nat. Sci. Ed.)*, 41(1): 199 – 202. [陈瑞旭，王露洁，林涛，韦志强，王焱，郝德君，2017. 松墨天牛的人工饲育技术研究. 南京林业大学学报(自然科学版)，41(1): 199 – 202]

Enayati AA, Ranson H, Hemingway J, 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol. Biol.*, 14(1): 3 – 8.

Feng B, Guo QS, Mao BP, Du YJ, 2016. Identification and selection of valid reference genes for assaying gene expression in the chemosensory tissues of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) by RT-qPCR. *Acta Entomol. Sin.*, 59(4): 427 – 437. [冯波，郭前爽，毛必鹏，杜永均，2016. 松墨天牛化学感受组织荧光定量 PCR 内参基因的鉴定与筛选. 昆虫学报，59(4): 427 – 437]

Garrido C, Paul C, Seigneuric R, Kampinga HH, 2012. The small heat shock proteins family: the long forgotten chaperones. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 44(10): 1588 – 1592.

Gkouvitsas T, Kontogiannatos D, Kourti A, 2008. Differential expression of two small Hsps during diapause in the corn stalk borer *Sesamia nonagrioides* (Lef.). *J. Insect Physiol.*, 54(12): 1503 – 1510.

Hayes D, Napoli V, Mazurkie A, Stafford WF, Graceffa P, 2009. Phosphorylation dependence of Hsp27 multimeric size and molecular chaperone function. *J. Biol. Chem.*, 284(28): 18801 – 18807.

Hayward SA, Pavlides SC, Tammariello SP, Rinehart JP, Denlinger DL, 2005. Temporal expression patterns of diapause-associated genes in flesh fly pupae from the onset of diapause through post-diapause quiescence. *J. Insect Physiol.*, 51(6): 631 – 640.

Hellemans J, Mortier G, Paepe AD, Speleman F, Vandesompele J, 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.*, 8(2): R19.

Huang LH, Kang L, 2007. Cloning and interspecific altered expression of heat shock protein genes in two leafminer species in response to thermal stress. *Insect Mol. Biol.*, 16(4): 491 – 500.

Huang LH, Wang CZ, Kang L, 2009. Cloning and expression of five heat shock protein genes in relation to cold hardening and development in the leafminer, *Liriomyza sativa*. *J. Insect Physiol.*, 55(3): 279 – 285.

King AM, Macrae TH, 2015. Insect heat shock proteins during stress and diapause. *Annu. Rev. Entomol.*, 60(1): 59 – 75.

Kong WN, Wang H, Li J, Zhao F, Ma RY, 2006. The effects of temperature and humidity on the longevity of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae). *Shanxi Agric. Univ. (Nat. Sci. Ed.)*, 26(3): 294 – 295. [孔维娜，王慧，李捷，赵飞，马瑞燕，2006. 温湿度对松墨天牛越冬幼虫寿命的影响. 山西农业大学学报(自然科学版)，26(3): 294 – 295]

Kostenko S, Moens U, 2009. Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66(20): 3289 – 3307.

Lin T, Cai Z, Wu H, 2015. Transcriptome analysis of the Japanese pine sawyer beetle, *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) by high-throughput Illumina sequencing. *J. Asia-Pacific Entomol.*, 18(3): 439 – 445.

Liu QN, Zhu BJ, Dai LS, Fu WW, Lin KZ, Liu CL, 2013. Overexpression of small heat shock protein 21 protects the Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi* against thermal stress. *J. Insect Physiol.*, 59(8): 848 – 854.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402 – 408.

Lu Y, Yuan M, Gao X, Kang T, Zhan S, Hu W, Li JH, 2013. Identification and validation of reference genes for gene expression analysis using quantitative PCR in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS ONE*, 8(7): e68059.

Luo LL, Wu HJ, Lin T, 2015. Characterization and expression of subunit D gene of ATP synthase from *Monochamus alternatus*. *Sci. Silv. Sin.*, 51(7): 60 – 68. [罗淋淋，吴华俊，林同，2015. 松墨天牛 ATP 合成酶 D 亚基基因的鉴定与表达. 林业科学，51(7): 60 – 68]

Marionnet C, Bernerd F, Dumas A, Verrecchia F, Mollier K, Compan D, Bernard D, Lahfa M, Leclaire J, Medaisko C, Mehul B, Seite S, Mauviel A, Dubertret L, 2003. Modulation of gene expression induced in human epidermis by environmental stress *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.*, 121(6): 1447 – 1458.

Pan DD, Lu MX, Li QY, Du YZ, 2018. Characteristics and expression of genes encoding two small heat shock protein genes lacking introns from *Chilo suppressalis*. *Cell Stress Chaperones*, 23(1): 55 – 64.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP, 2004. Determination

of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: bestkeeper-excel-based tool using pair-wise correlations. *J. Biotechnol. Lett.*, 26(6): 509–515.

Qian K, Feng B, Wu XL, Lao C, Shen YL, Du YJ, 2015. Cloning, sequence analysis, tissue expression profiling and prokaryotic expression of odorant binding protein genes *MaltOBP*2 and *MaltOBP*6 from *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Acta Entomol. Sin.*, 58(5): 496–506. [钱凯, 冯波, 巫诩亮, 劳冲, 沈幼莲, 杜永均, 2015. 松墨天牛 OBP 基因 *MaltOBP*2 和 *MaltOBP*6 的克隆、序列分析及组织表达谱和原核表达研究. 昆虫学报, 58(5): 496–506]

Quan G, Duan J, Ladd T, Krell PJ, 2018. Identification and expression analysis of multiple small heat shock protein genes in spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (L.). *Cell Stress Chaperones*, 23(1): 141–154.

Rinehart JP, Li A, Yocum GD, Robich RM, Hayward SA, Denlinger DL, 2007. Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(27): 11130–11137.

Shen Y, Gu J, Huang LH, Zheng SC, Liu L, Xu WH, Feng QL, Kang L, 2011. Cloning and expression analysis of six small heat shock protein genes in the common cutworm, *Spodoptera litura*. *J. Insect Physiol.*, 57(7): 908–914.

Sonoda S, Fukumoto K, Izumi Y, Ashfaq M, Yoshida H, Tsumuki H, 2006. A small HSP gene is not responsible for diapause and cold tolerance acquisition in *Chilo suppressalis*. *J. Appl. Entomol.*, 130(5): 309–313.

Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V, 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.*, 6(11): 1025–1037.

Takahashi KH, Rako L, Takano-Shimizu T, Hoffmann AA, Lee SF, 2010. Effects of small *Hsp* genes on developmental stability and microenvironmental canalization. *BMC Evol. Biol.*, 10(1): 1–11.

van Montfort RLM, Basha E, Friedrich KL, Slingsby C, Vierling E, 2001. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat. Struct. Biol.*, 8(12): 1025–1030.

Vandesompele J, Preter KD, Pattyn F, Poppe B, Roy NV, Paepe AD, Speleman F, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 3(7): 1–12.

Wang H, Fang Y, Bao Z, Jin X, Zhu WJ, Wang L, Liu T, Ji HP, Wang HY, Xu SQ, Sima YH, 2014. Identification of a *Bombyx mori*, gene encoding small heat shock protein BmHsp27.4 expressed in response to high-temperature stress. *Gene*, 538(1): 56–62.

Wang HJ, Shi ZK, Shen QD, Xu CD, Wang B, Meng ZJ, Wang SG, Tang B, Wang S, 2017. Molecular cloning and induced expression of six small heat shock proteins mediating cold-hardiness in *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Front. Physiol.*, 8: 60–74.

Wu QY, 1981. Role of fat body in metabolism in insects. *Entomol. Knowl.*, 18(2): 92–95. [吴秋雁, 1981. 昆虫脂肪体的代谢作用. 昆虫知识, 18(2): 92–95]

Zhang YY, Liu YL, Guo XL, Li YL, Gao HR, Guo XQ, Xu BH, 2014. *sHsp*22.6, an intronless small heat shock protein gene, is involved in stress defence and development in *Apis cerana cerana*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 53(2): 1–12.

Zhao L, Jones WA, 2012. Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. *Invert. Surv. J.*, 9(1): 93–101.

Zhu JR, Chai XM, He ZH, 2001. Effects of temperature and light on the growth of *Monochamus alternatus*. *J. Zhejiang Sci. Tech.*, 21(4): 27–29. [朱锦茹, 柴希民, 何志华, 2001. 温度和光照对松褐天牛生长的影响. 浙江林业科技, 21(4): 27–29]

（责任编辑：马丽萍）